



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 181 294** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **A 61 K 39/07, C 12 N 1/04**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 99117036/13, 11.08.1999
(24) Дата начала действия патента: 11.08.1999
(46) Дата публикации: 20.04.2002
(56) Ссылки: RU 2115433 C1, 20.07.1998. RU 2095409 C1, 10.11.1997. RU 2123532 C1, 20.12.1998.
(98) Адрес для переписки:
610000, г.Киров-Центр, Октябрьский пр-т,
119, НИИМ МО РФ

(71) Заявитель:
Научно-исследовательский институт
микробиологии МО РФ
(72) Изобретатель: Кожухов В.В.,
Пименов Е.В., Сероглазов В.В., Юдников
В.А., Меновщиков В.А.
(73) Патентообладатель:
Научно-исследовательский институт
микробиологии МО РФ

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СУХОЙ КОМБИНИРОВАННОЙ СИБИРЕЯЗВЕННОЙ ВАКЦИНЫ

(57)
Изобретение относится к медицинским иммунобиологическим препаратам, в частности к сибиреязвенным вакцинам, и может быть использовано в медицине и ветеринарии для профилактики сибирской язвы. Сущность изобретения заключается в использовании для приготовления сухой формы комбинированной сибиреязвенной

вакцины протективного антигена, получаемого из микробной культуры *Bacillus anthracis* штамма-продуцента 55/5, выборе эффективной среды высушивания и лиофилизации препарата. Изобретение позволяет увеличить срок хранения вакцины (до 4 лет) и расширить температурный режим хранения (до плюс 25 °С в течение месяца) при доставке вакцины потребителю. 4 табл.

RU 2 181 294 C2

RU 2 181 294 C2



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 181 294** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **A 61 K 39/07, C 12 N 1/04**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 99117036/13, 11.08.1999

(24) Effective date for property rights: 11.08.1999

(46) Date of publication: 20.04.2002

(98) Mail address:
610000, g.Kirov-Tsentr, Oktjabr'skij pr-t,
119, NIIM MO RF

(71) Applicant:
Nauchno-issledovatel'skij institut
mikrobiologii MO RF

(72) Inventor: Kozhukhov V.V.,
Pimenov E.V., Seroglazov V.V., Judnikov
V.A., Menovshchikov V.A.

(73) Proprietor:
Nauchno-issledovatel'skij institut
mikrobiologii MO RF

(54) **METHOD TO OBTAIN DRY COMBINED ANTHRAX VACCINE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, immunobiology,
veterinary science, anthrax prophylaxis.
SUBSTANCE: the method deals with applying
protective antigen obtained out of Bacillus
anthracis microbial culture of 55/5 producer
strain, selecting efficient medium to dry

and lyophilize the preparation in question.
Innovation enables to obtain prolonged terms
of vaccine storage (up to 4 years) and
enlarge temperature storage rate (up to +25
C during a month) while delivering the
vaccine to a consumer. EFFECT: higher
efficiency. 4 tbl

RU 2 181 294 C2

RU 2 181 294 C2

Изобретение относится к медицинским иммунобиологическим препаратам, в частности к сибиреязвенным вакцинам, и может быть использовано в медицине и ветеринарии для специфической профилактики сибирской язвы.

Известна живая сухая сибиреязвенная вакцина, выпускаемая НИИМ МО РФ (г. Киров). Общим признаком ее приготовления с заявляемым способом является использование в качестве иммуногена спор *Bacillus anthracis* штамма СТИ-1 и криопротектора - сахарозы в конечной концентрации 8...10%. Недостатком живой вакцины является длительный период формирования напряженного иммунитета (до 3 недель) и относительно короткий период высокой специфической резистентности (Бургасов П.Н., Черкасский Б.Л. // Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол. - 1976, 9, с. 27-35).

Наиболее близким к заявляемому является способ приготовления жидкой комбинированной сибиреязвенной вакцины (патент РФ 2115433), содержащей сорбированный на носителе протективный антиген (ПА) и споры *Bacillus anthracis* вакцинного штамма СТИ-1. Содержание компонентов в одной прививочной человеко-дозе (0,5 см³) вакцины следующее: спор - 40...60 млн, ПА - 30...40 среднеэффективных иммунизирующих доз (ИД₅₀) для белых мышей (Дербин М.И. с соавт. // Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол. - 1977, 2, с. 63-67), гидроокиси алюминия - не более 2,5 мг. Общим существенным признаком с заявляемым способом является использование в жидкой комбинированной вакцине спор *Bacillus anthracis* штамма СТИ-1. Недостатком вышеуказанной вакцины является относительно непродолжительный срок хранения (до 2-х лет) и необходимость в течение всего времени хранения, в том числе и при ее транспортировании, использовать температуры от 0 до плюс 4°C. Увеличение сроков хранения жидкой комбинированной вакцины, а также изменение температурного режима при хранении или транспортировании сопровождается ослаблением защитных свойств вакцины за счет снижения иммуногенности ПА и жизнеспособности спор (споры и ПА находятся в препарате в физиологическом растворе без стабилизатора и в большей степени подвержены отрицательному воздействию факторов внешней среды, в том числе и температурным колебаниям).

Задачей изобретения является получение сухой комбинированной сибиреязвенной вакцины, длительно сохраняющей иммуногенные свойства в рациональных и удобных для потребителя условиях хранения и транспортирования.

Поставленная задача решается выбором нового штамма с более высокой и устойчивой продукцией ПА, достаточной для приготовления жидкого полуфабриката, разработкой рациональных отношений компонентов вакцины и защитной среды, отработка режимов технологического процесса лиофильного высушивания, обеспечивающих стабильность иммунологических свойств комбинированной вакцины, длительность ее хранения и

рациональные температурно-временные режимы транспортирования.

Сухая форма комбинированной сибиреязвенной вакцины обеспечивает длительное хранение (до 4 лет) препарата, по иммунологическим и физико-химическим показателям удовлетворяющего требованиям, предъявляемым национальным органом контроля медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП) к вакцинам.

Изобретение позволяет:

1. Повысить стабильность иммунологических свойств вакцины и увеличить срок ее хранения до 4 лет;

2. Сократить расходы на пополнение запасов вакцины, упростить и удешевить условия транспортирования, снизить риск ухудшения ее качества на этапах хранения, транспортирования и применения.

Сухая комбинированная сибиреязвенная вакцина состоит из следующих компонентов:

- сорбированного ПА, получаемого из *Bacillus anthracis* штамма 55/5. Штамм *Bacillus anthracis* 55/5, регистрационный номер 11 депонирован 15.10.95 г. в музейной коллекции стандартизованных микроорганизмов института микробиологии МО РФ (НИИМ МО РФ, г. Киров);

- спор *Bacillus anthracis* штамма СТИ-1;

- сахарозы;

- геля гидроокиси алюминия.

Одна прививочная доза вакцины (в объеме 0,5 см³) содержит (40...60) млн спор штамма СТИ-1, (30...40) ИД₅₀ ПА, не более 0,2 мг общего азота, не более 2,5 мг окиси алюминия, не более 0,0005% формальдегида и (18...22) мг сахарозы.

Возможность практического использования заявляемого изобретения подтверждается следующими примерами.

Пример 1. Выбор штамма-продуцента протективного антигена.

Аттенуированный высокоиммуногенный бескапсульный штамм *Bacillus anthracis* 55/5 был получен из гетерогенной (до 30%) по детерминантам *pag*, *lef*, *суа* исходной культуры *Bacillus anthracis* штамма 55 ВНИИВВиМ. Способ получения включал в себя ряд последовательно выполняемых операций:

- термовоздействие на споры (при температуре плюс 83°C в течение 10 мин);

- пассаж микробных клеток через организм морской свинки;

- отбор на содержащей сибиреязвенный глобулин и бикарбонат-ион (индуктор синтеза токсина) плотной питательной среде *Tox*⁺ - клонов с наиболее выраженной зоной иммунопреципитации;

- тестирование методом полимеразной цепной реакции ДНК клеток на полноразмерность и целостность детерминант протективного антигена, летального и отечного факторов (*pag*, *lef*, *суа*) и отбор генетически полноценного *Tox*⁺ - клона 5;

- приготовление стабилизированной споровой однородной культуры *B. anthracis* штамма 55/5 НИИМ МО РФ, обладающего высокой и стабильно воспроизводимой продукцией защитного антигена.

Характеристика ПА, получаемого с использованием штаммов *Bacillus anthracis* СТИ-1 и 55/5 НИИМ МО РФ, приведена в

таблице 1. Антигенную активность ПА определяли в реакции диффузионной преципитации с сибиреязвенным иммуноглобулином, а иммуногенность на белых мышах путем расчета ИД₅₀.

Из приведенных в таблице 1 данных видно, что, в сравнении со штаммом *Bacillus anthracis* СТИ-1, использование штамма *Bacillus anthracis* 55/5 НИИМ МО РФ позволяет стабильно получать как нативный, так и концентрированный ПА с более высокими иммунологическими показателями, что обеспечивает возможность его использования для приготовления жидкого полуфабриката комбинированной вакцины и последующего лиофильного высушивания.

Пример 2. Выбор оптимальной среды высушивания.

В качестве протектора при приготовлении сухих форм иммунобиологических препаратов используется сахароза, отличающаяся хорошим защитным эффектом. Так как в состав комбинированной вакцины входит чувствительный к колебаниям температуры ПА, необходимо было определить, какое влияние оказывает сахароза при его высушивании. Концентрат ПА, лиофильно высушенный с добавлением сахарозы в различной концентрации, оценивали по показателю антигенной активности в реакции диффузионной преципитации с иммуноглобулином и содержанию ИД₅₀. Результаты приведены в таблице 2. Анализ представленных в таблице 2 результатов показывает, что при лиофильном высушивании ПА с добавлением сахарозы в конечной концентрации 8...10% по объему антигенная и иммуногенная активность препарата практически сохраняется на исходном (до высушивания) уровне.

Пример 3. Способ приготовления сухой комбинированной сибиреязвенной вакцины.

Споровую суспензию *Bacillus anthracis* штамма СТИ-1 разводят стерильным физиологическим раствором до концентрации 0,8...1,2 млрд спор·см⁻³. Полученную суспензию смешивают со стерильным 40%-ным раствором сахарозы в объемных соотношениях 1:1 и тщательно перемешивают в течение 15...20 мин. Концентрат сорбированного ПА разводят стерильным физиологическим раствором до содержания 400 ИД₅₀·см⁻³. Равные объемы приготовленных компонентов объединяют и тщательно перемешивают. В приготовленном жидком полуфабрикате комбинированной вакцины должно содержаться 200...300 млн спор·см⁻³ и 180...220 ИД₅₀·см⁻³ ПА. Приготовленный полуфабрикат вакцины разливают по 2 см³ (10 прививочных доз) в ампулы вместимостью 6 см³ или флаконы объемом 10 см³. В процессе розлива содержимое емкости с приготовленным полуфабрикатом перемешивают каждые 20...25 мин с целью получения однородного состава препарата.

Лиофильное высушивание вакцины осуществляют в камерных сушильных установках, обеспечивающих нижеуказанный режим:

- температура замораживания суспензии - минус 35...40°C;
- время выдерживания - 3...4 ч;
- разряжение в сублиматоре - 20...25 Па;

- досушивание материала при температуре плюс 30...32°C в течение 10...12 ч.

Пример 4. Влияние температуры хранения на иммуногенные свойства сибиреязвенного ПА.

Влияние температуры хранения на иммуногенные свойства ПА *Bacillus anthracis* штамма 55/5, сорбированного на геле гидроокиси алюминия, изучали в опытах на лабораторных животных. В опыте использовали лиофильно высушенный в 10% сахарозе сорбированный ПА. Контролем служил исходный жидкий сорбированный препарат. Из представленных в таблице 3 данных следует, что процесс лиофильного высушивания с криопротектором (сахароза) не сопровождается снижением иммуногенных свойств препарата. После хранения при температуре плюс 25°C в течение месяца у исходного жидкого сорбированного ПА происходит снижение в 3 раза величины ИД₅₀. Вместе с тем, при тех же условиях хранения лиофильно высушенного сорбированного ПА не происходит изменения защитной эффективности препарата (величина ЛД₅₀ практически не изменяется).

Таким образом, показано, что лиофильное высушивание с сахарозой сорбированного ПА *Bacillus anthracis* штамма 55/5 позволяет сохранить его иммуногенные свойства при температуре плюс 25°C в течение месяца по сравнению с исходным жидким препаратом.

Пример 5. Влияние продолжительности хранения и температуры на иммуногенные свойства и реактогенность жидкой и сухой комбинированных сибиреязвенных вакцин.

В экспериментах использовали жидкую комбинированную вакцину на основе спор *Bacillus anthracis* штамма СТИ-1 и ПА этого же штамма и сухую комбинированную вакцину из спор *Bacillus anthracis* штамма СТИ-1 и ПА *Bacillus anthracis* штамма 55/5, которые характеризовали по индексу иммунитета (ИИ) на момент приготовления, после хранения в течение 2-х и 4-х лет при температуре плюс 2...6°C, а также после переменных режимов хранения: 4-х лет хранения в условиях субнулевых температур с последующим переводом на режим транспортирования при температуре плюс 25°C в течение 25 суток. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 4. Из данных таблицы 4, видно, что исследуемые жидкая и сухая комбинированные вакцины обладали практически одинаковым защитным эффектом после приготовления. Результаты оценки иммуногенности этих препаратов после хранения в течение 2-х лет при температуре плюс 2...6°C свидетельствуют о том, что величина ИИ для морских свинок у обоих препаратов практически не изменилась, что подтверждает сохранение препаратами защитных свойств при хранении в указанных условиях. Оценка вакцин после хранения в течение 4-х лет в условиях субнулевых температур показала, что величина ИИ у сухой комбинированной вакцины практически сохранилась на исходном уровне и более чем в 2 раза превысила значение данного показателя у жидкой комбинированной вакцины. Изучение иммуногенных свойств препаратов после 4-х лет хранения с переводом режима хранения на режим

транспортирования при температуре плюс 25 °С в течение 25 суток показало, что при этом режиме жидкая комбинированная вакцина в 2,5 раза снижает свои защитные свойства. Снижение величины ИИ у жидкой комбинированной вакцины объясняется уменьшением иммуногенности входящего в состав вакцины ПА. Наблюдаемый при этом защитный эффект препарата обеспечивается за счет спорового компонента вакцины. Изучение иммуногенных свойств сухой комбинированной вакцины после 4-х лет хранения при температуре плюс 2...6 °С с переводом режима на плюс 25°С в течение 25 суток показало, что сухая комбинированная вакцина сохраняет высокие иммуногенные свойства практически без изменений, в то время как у жидкой комбинированной вакцины наблюдается дальнейшее снижение защитных свойств.

Реактогенность сухой комбинированной вакцины после 4-х лет хранения с переводом на режим транспортирования изучали в экспериментах на кроликах в сравнении с жидкой комбинированной вакциной. Для обеих вакцин на 2...6 сутки после вакцинации наблюдалось кратковременное и незначительное до 7% снижение массы животных, восстановление которой происходило уже на 10 сутки. Повышение в ряде случаев температуры тела у животных не превышало 1°С от принятых физиологических значений. Наблюдаемые у вакцинированных животных отклонения массы и температуры тела укладывались в требования нормативных документов.

Таким образом, в результате исследований установлено, что сухая форма комбинированной вакцины из спор *Bacillus anthracis* штамма СТИ-1 и ПА *Bacillus anthracis* штамма 55/5 при заданных сроках ее хранения и транспортирования обеспечивает сохранение умеренной реактогенности в тех же значениях показателей как и у применяемой жидкой комбинированной в нормативные сроки ее хранения.

Для производства и выпуска вакцины в Научно-исследовательском институте микробиологии Министерства обороны Российской Федерации создана технологическая линия. Инструкция по применению сухой комбинированной вакцины утверждена зам. министра здравоохранения РФ 18.07.1996 г.

Формула изобретения:

Способ получения сухой комбинированной сибиреязвенной вакцины, включающий приготовление композиции из сорбированного на носителе протективного антигена и спор *Bacillus anthracis* штамма СТИ-1, отличающийся тем, что протективный антиген получают из *Bacillus anthracis* штамма 55/5 НИИМ МО РФ, дополнительно вводят в указанную композицию сахарозу в конечной концентрации 8-10% по объему и лиофильно высушивают в установке камерного типа при температуре замораживания минус 35-40 °С, времени выдерживания 3-4 ч, разрежении в сублиматоре не выше 20-25 Па и досушивают материал при температуре плюс 30-32°С в течение 10-12 ч.

35

40

45

50

55

60

Таблица 1

Характеристика протективного антигена (ПА),

получаемого с использованием *Bacillus anthracis* штаммов

СТИ-1 и 55/5

Штамм	Антигенная активность...ПА, ЕА·см ⁻³		Иммуногенность сорбированного
	нативного	сорбированного концентрата	концентрата ПА, ИД ₅₀ ·см ⁻³
СТИ-1	100±50	940±260	230±90
55/5	150±50	1200±380	520±110
Требования нормативно- технологичес- кой докумен- тации	100, не менее	800, не менее	400, не менее (150, не ме- нее*)
Примечание. *- Приведены требования к концентрату ПА, используемому для приготовления жидкой комбинированной вакцины.			

RU 2181294 C2

RU 2181294 C2

Таблица 2

Влияние концентрации сахарозы на биологические свойства сибирязевого ПА при лиофильном высушивании

Препарат	Концентрация сахарозы, процент	Антигенная активность, ЕА см ⁻³	Иммуногенность, ИД ₅₀ см ⁻³
Лиофильно высушенный	0	200	140±50
	2	400	180±60
	4	400	230±70
	8	800	460±110
	10	800	500±90
	15	800	480±100
Жидкий (контроль)	0	800	520±130

Таблица 3

Иммуногенность жидкого и лиофильно высушенного препаратов ПА после хранения при температуре плюс 25°C в течение месяца.

Препарат ПА	Концентрация сахарозы, процент	Иммуногенность ... препарата, ИД ₅₀ см ⁻³ .	
		свежеприготовленного	хранившегося
Лиофильно высушенный	10	480±120	430±90
Жидкий	0	520±130	170±60

Оценка индекса иммуногенности (ИИ) на морских свинках, привитых заявляемой вакциной и вакциной прототипом после приготовления и длительного хранения с переменными режимами

Таблица 4

Вакцина	ИИ для морских свинок, привитых вакциной				Требования к ИИ	нормативный документ к показателю
	после приготовления	хранившейся 2 года при плюс 2...6°C	хранившейся 4 года при плюс 2...6°C	хранившейся 4 года при плюс 2...6°C и 25 суток при плюс 25°C		
Жидкая КВ	$(164 \pm 28) \cdot 10^3$	$(118 \pm 16) \cdot 10^3$	$(68 \pm 10) \cdot 10^3$	$(32 \pm 10) \cdot 10^3$		
Сухая КВ	$(152 \pm 48) \cdot 10^3$	$(142 \pm 30) \cdot 10^3$	$(126 \pm 26) \cdot 10^3$	$(120 \pm 20) \cdot 10^3$		
Примечание: КВ - комбинированная вакцина						